

To prepare a multivalent diagnosticum, 0.1 ml of a sera mixture is taken, 0.9 ml of a 10% suspension of a formalin (a 0.5% solution of formaldehyde, 2 h) and heat (85°C, 2 h) stabilized and centrifugation washed Cowan 1 strain of *Staphylococcus aureus* is added, thoroughly stirred and adjusted with PBS to 1 ml. A campylobacteriosis diagnosticum thus prepared is controlled by performing the slide coagglutination test (CAT) in the presence of LPS or heated (100°C, 1 h) cultures of the most prevalent serotypes of *Campylobacter jejuni*, *coli*, *laridis* taken at different dilutions to determine the sensitivity of a formulation, as well as in the presence of the other enterobacteria to determine the specificity of the formulation. To perform CAT, a one drop of an each LPS dilution (10x, 10^{-1} to 10^{-4} mg/ml) is applied on a slide separated with a hectographic pencil into sectors, and a one drop of the sensitized *Staphylococcus* (the diagnosticum) is added to it. In control N 1, a one drop of a non-sensitized *Staphylococcus* (a negative control) is applied, instead of the diagnosticum, and in control N 2, *Campylobacter* LPS diluted in PBS (a positive control) is added to the diagnosticum. The drops are carefully stirred by shaking the glass for 3 to 5 min, placed in a moist chamber for 30 min. Evaluation of the test is carried out on a 4+ scale, a *Staphylococcus* agglutination value of 2+ being considered positive.



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 086 984⁽¹⁵⁾ C1
(51) МПК G 01 N 33/531, 33/53

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 95108338/14, 22.05.1996

(46) Дата публикации: 10.06.1997

(56) Ссылки: 1. Wong H. H. et al. Typing of Heat-stable and Heat-labile antigens of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Coagglutination. J. of Clinical Microbiol., 1985, v. 21, p. 702 - 707.

(71) Заявитель:
Белая Юлия Александровна,
Белая Ольга Федоровна,
Быстрова Светлана Михайловна,
Петрухин Владимир Григорьевич,
Прокофьева Елена Михайловна
(72) Изобретатель: Белая Юлия Александровна,
Белая Ольга Федоровна, Быстрова Светлана
Михайловна, Петрухин Владимир
Григорьевич, Прокофьева Елена Михайловна
(73) Патентообладатель:
Белая Юлия Александровна,
Белая Ольга Федоровна,
Быстрова Светлана Михайловна,
Петрухин Владимир Григорьевич,
Прокофьева Елена Михайловна

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ АНТИГЕНОВ КАМПИЛОБАКТЕРОВ

(57) Резюме:
Назначение: биотехнология, в частности, клиническая и ветеринарная микробиология и иммунология, для экспресс-диагностики кампилобактериозов у людей и животных, выявление кампилобактеров в пищевых продуктах, кормах и объектах внешней среды. Сущность: получают сыворотки при иммунизации кроликов, убитые ацетоном и прогнетые, для разрушения термостабильных

антигенов культурами кампилобактеров, отобранных из числа наиболее часто встречающихся в патологии серотипов и имеющих максимальный набор термостабильных антигенов, полученные сыворотки от разных животных смешиваются, сенсибилизируются клетками *Staphylococcus aureus* Cowan I, отмываются, ресуспендируются и консервируются. 2 з.п. ф-лы, 3 табл.

RU 2 086 984 C1

RU 2 086 984 C1



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 086 984** (13) **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **G 01 N 33/531, 33/53**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 95108338/14, 22.05.1996

(46) Date of publication: 10.08.1997

(71) Applicant:

Belaja Julija Aleksandrovna,
Belaja Olga Fedorovna,
Byistrova Svetlana Mikhajlovna,
Petrukhin Vladimir Grigor'evich,
Prokofeva Elena Mikhajlovna

(72) Inventor: Belaja Julija Aleksandrovna,
Belaja Olga Fedorovna, Byistrova Svetlana
Mikhajlovna, Petrukhin Vladimir
Grigor'evich, Prokofeva Elena Mikhajlovna

(73) Proprietor:

Belaja Julija Aleksandrovna,
Belaja Olga Fedorovna,
Byistrova Svetlana Mikhajlovna,
Petrukhin Vladimir Grigor'evich,
Prokofeva Elena Mikhajlovna

(54) **METHOD OF PREPARING DIAGNOSTICUM FOR DETECTION OF CAMPYLOBACTER THERMOSTABLE ANTIGENS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, veterinary
microbiology, immunology. SUBSTANCE:
method involves preparing sera at rabbit
immunization with campylobacter cultures
killed with scalone and heating in order to
destruct thermostable antigens.
Campylobacters were selected from the most
occurring serotypes in pathology and showing
maximal set of thermostable antigens. Sera

obtained from different animals were mixed,
sensitized with cells Staphylococcus
aureus CowanI, washed off, resuspended and
preserved. Method is used for
express-diagnosis campylobacteriosis in
human and animals, detection of
campylobacteria in foodstuffs and
environment objects. EFFECT: improved method
of preparing. 3 cl, 3 tbl

RU 2 086 984 C1

RU 2 086 984 C1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности, к клинической и ветеринарной микробиологии и иммунологии, и предназначено для экспрессной диагностики кампилобактериозов у людей и животных. Выявления кампилобактеров в пищевых продуктах, кормах и объектах внешней среды.

Известен способ получения диагностикума для выявления термостабильных антигенов *Campylobacter jejuni* и *Campylobacter coli* с помощью коагуляции, предусматривающий получение сывороток к живым культурам кампилобактеров всех существующих серотипов (порядка 57), сенсibilизацию лиофилизированных клеток *S. алма* Cowan 1, инкубирование в течение 1 ч при комнатной температуре, отмывание в ФСБ при центрифугировании и суспензирование в ФСБ, консервирование 0,05 объема натрия. Таким образом получают моноспецифический, который используют в РКА на стекле с живыми и убитыми культурами исследуемых штаммов. Этот способ выбран в качестве ближайшего аналога. Однако известные диагностикумы пригодны только для серотипирования культур, метод серотипирования многостадийный и не пригоден для выявления антигенов непосредственно в исследуемом материале. Коммерческих наборов для выявления антигенов кампилобактеров реакцией коагуляции в известной нам литературе не имеется.

Техническим результатом, достигаемым при использовании способа, является то, что полученный диагностикум пригоден для выявления термостабильных антигенов кампилобактеров не только в культурах, но также непосредственно в исследуемом материале, что упрощает диагностику (РКА ставят одностапно) и значительно сокращает время проведения анализа. Он достигается тем, что из набора часто встречающихся при патологии человека и животных серотипов кампилобактеров отбирают несколько культур, имеющих в своем составе максимальный спектр термостабильных антигенов, для иммунизации кроликов используют убитых в ацетоне и прогреванием при температуре 100 °C в течение 1 ч культуры, иммунизацию проводят многократно внутривенно возрастающими дозами от 1,0 до 16,0 млрд микр. кл. кампилобактеров с двумя повторными циклами после каждого взятия крови, для сенсibilизации стафилококка используют смесь полученных сывороток. Диагностикум для выявления кампилобактеров реакцией коагуляции представляет собой комплект, включающий емкость, заполненную диагностикумом, вторую емкость с несенсибилизированным стафилококком для отрицательного контроля и третью емкость для положительного контроля.

Известно, что наиболее распространенными серотипами кампилобактеров по схеме Лиг являются: L1, L2, L4, L5, L6, L7, L9, L11, K16, K17 и L36, которые составляют 70 всех выделенных культур. Наиболее распространенными штаммами, серотипированными по термостабильным антигенам 0 в США являются P1, P2, P4, P5, P3, P10, P16, P18, P21, P25, которые составляют 73,7 выделенных штаммов, у нас в стране L1, L5,

L6, L7. При этом культуры серотипов по схеме Лиг часто сочетаются с наиболее распространенными 0-антигенами по схеме Penner, так, L1 часто сочетается с P2 (59) и L4 с P3 (11); серотип L36 с P2, P4 и P8 (19 15 11 соответственно); L1 с P4 и P1 (36 и 27 соответственно); L6 с P25, P17 и P7 (34 33 и 22 соответственно); L16 с P10 и P5 в 77 и 22 соответственно.

Исходя из этих данных, для дальнейшей разработки диагностикума для РКА, исследования специфических и перекрестно-реагирующих антигенов, а также для получения антисывороток был использован набор культур кампилобактеров из 14 наиболее распространенных в патологии человека и животных серотипов кампилобактеров.

Пример 1. Получение сывороток к каждому серотипу кампилобактеров (подготовительный этап).

Для получения сывороток были испытаны описанные в литературе, а также специально разработанные схемы иммунизации кроликов. Из 6 испытанных методов, в которых применялись формализированные, гнетые при 100 °C культуры в течение 1 ч и 2 ч, ЛПС, полученные горячим фенольным методом по Вестфалу и Джен (1965), с адъювантом Фрейнда и без него, в разных дозах, мы остановились на оригинальном, разработанном нами методе получения антисывороток к термостабильным антигенам, который заключается в следующем. Кролики породы шиншилла весом 2,5-3,0 кг иммунизировались убитой и высушенной в ацетоне микробной массой кампилобактеров после прогревания ее при 100 °C в течение 1 ч, внутривенно, один раз в неделю в возрастающих дозах от 1,0 млрд микр. кл. до 16,0 млрд микр. кл. (I цикл); 4,0, 8,0 и 16,0 млрд микр. кл. (II цикл); 10,0 и 16,0 млрд микр. кл. (III цикл). После каждого цикла вакцинации на 7-10 день брали кровь из ушной вены. Сыворотки исследовали в реакции преципитации и иммуноэлектрофореза в агаре с ЛПС каждого штамма и перекрестно.

Пример 2. Подготовительный этап-отбор штаммов для получения диагностикума кампилобактериозного для реакции коагуляции.

Методом иммуноэлектрофореза в агаре и преципитации в геле было установлено, что многие сыворотки к изученным культурам кампилобактеров (10 из 15) имеют в своем составе, кроме антител к гомологичным термостабильным антигенам 0 этих бактерий, также антитела к гетерологичным 0-антигенам других серотипов, причем некоторые сыворотки имеют антитела к двум или даже шести термостабильным 0-антигенам.

На основании этих данных в смесь сывороток для приготовления кампилобактериозного поливалентного коагулирующего диагностикума можно было взять 3-4 сыворотки, при этом она содержала бы антитела ко всем исследованным культурам кампилобактеров.

Так, из табл. 1 видно, что сыворотка к штамму 4 выявляет термостабильные антигены штамма 5 и наоборот, сыворотка к штамму 6 выявляет моноспецифический; сыворотка к штамму 35 выявляет антиген также штамма 21 наряду с гомологичным

RU 2 086 984 C1

RU 2 086 984 C1

антигеном; сыворотка к штамму 21 имеет антитела к термостабильным антигенам сероваров 1, 2, 6, 20, 21, 35. Таким образом; для смеси можно было взять эти 4 сыворотки. Данный пример не ограничивает предмет изобретения.

Пример 3. Получение кампилобактериозного диагностикума (конечный этап).

Для получения сывороток, которые содержат бы антитела ко всем термостабильным антигенам наиболее часто встречающихся серотипов кампилобактеров, берут штаммы кампилобактеров, имеющие максимальный набор термостабильных антигенов этих серотипов, выращивают на твердой питательной среде, смывают физиологическим раствором (0,9 хлорида натрия), взвесь microbes заливают тремя объемами ацетона, через сутки дважды отжимают савками порциями ацетона и высушивают microbes на воздухе. Убитые и высушенные ацетоном microbes каждого штамма растворяют 0,9-ным раствором хлорида натрия до концентрации 20-25 млрд микр. мл. прогревают в водяной бане при 100 °C в течение 1 ч и хранят при 2-6 °C в течение всего периода иммунизации. Кроликов иммунизируют, как указано в примере 1. Определяют рабочие разведения каждой гипериммунной кроличьей сыворотки. Необходимое для приготовления смеси, путем приготовления пробных диагностикумов для РКА и испытания их с гомологичным ЛПС. Готовят смесь этих сывороток, используя такие их соотношения, чтобы в смеси содержалось примерно равное количество антител к разным термостабильным антигенам, учитывая их разведения при изготовлении пробных диагностикумов. Например, если рабочие разведения первой, второй и третьей сывороток соответственно составляло 1:200, 1:400 и 1:400, то для приготовления смеси этих сывороток берут их соотношения как 2:1:1 (табл. 1).

Для приготовления поливалентного диагностикума берут 0,1 мл смеси сывороток, добавляют 0,9 мл 10-ной взвеси стабилизированной формалином (0,5 раствор формальдегида 2 ч) и прогреванием (95 °C 2 ч), отмытого при центрифугировании стафилококка *Staphylococcus aureus* штамм Cowan 1, тщательно перемешивают и доводят ФСБ до 10 мл. Приготовленный таким образом кампилобактериозный диагностикум контролируют путем постановки РКА на стекле с ЛПС или гелями (100 °C 1 ч) культурами наиболее часто встречающихся серотипов *Camphyllobacter jejuni*, *coli*, *laridis*, взятыми в различных разведениях, для определения чувствительности, а также другими энтеробактериями для определения специфичности препарата. Для постановки РКА одну каплю каждого разведения ЛПС (десятикратного, от 10^{-1} до 10^{-4} мг/мл) наносят на предметное стекло, разделенное на сектора стеклотрафом, и добавляют к ней одну каплю сансенсибилизированного стафилококка (диагностикума). В контроле N 1 вместо диагностикума помещают каплю несенсибилизированного стафилококка (отрицательный контроль), в контроле N 2 - к диагностикуму добавляют ЛПС *Camphyllobacter*, разведенный в ФСБ (положительный контроль). Капли осторожно перемешивают

покачиванием стекла в течение 3-5 мин, помещают во влажную камеру на 30 мин. Учет реакции проводят по 4-кратовой шкале, положительной считается агглютинация стафилококка № 2+.

Набор диагностикума для выявления термостабильных антигенов кампилобактеров включает: 1. емкость (ампула, флакон), заполненную диагностикумом в объеме 1-2 мл; 2. емкость, заполненную несенсибилизированным 1 стафилококком для отрицательного контроля 1-2 мл; 3. емкость, заполненную жидкостью для положительного контроля 1-2 мл.

Приготовленный кампилобактериозный диагностикум должен давать положительную реакцию коаггуляции со всеми наиболее распространенными культурами кампилобактеров разных серотипов или их 0-антигенами при концентрации последних 100 мкг/мл и более. Он не должен реагировать с 0-антигенами других видов бактерий (табл. 2).

Пример 4. Использование кампилобактериозного диагностикума для выявления термостабильных антигенов этих бактерий непосредственно в исследуемом материале.

Для определения термостабильных антигенов кампилобактеров материал (ксерофильтрат, слюна, моча, сыворотка крови, пищевые продукты, корма) прогревают в водяной бане при 100 °C в течение 30 мин, осветляют центрифугированием или фильтрацией. Одну каплю исследуемого материала наносят на предметное стекло, размеченное на сектора карандашом по стеклу, добавляют одну каплю диагностикума, осторожно перемешивают покачиванием стекла в течение 3-5 мин, оставляют во влажной камере на 30 мин при комнатной температуре. Учет реакции проводят визуально, отмечая интенсивность реакции над выпуклым зеркалом микроскопа. Положительной считается реакция № 2+. Контролем служат капля исследуемого материала с несенсибилизированным стафилококком (отрицательный контроль). Положительным контролем является реакция агглютинации диагностикума с ЛПС кампилобактеров, прикладываемого к набору. Разработанный диагностикум был испытан на материале от здоровых и больных людей, а также при исследовании птиц, яиц, содержимого кишечника, печени кур, а также материалов от работников птицефабрик (табл. 3).

Показана достаточно высокая чувствительность разработанного кампилобактериозного диагностикума в выявлении антигенов этих бактерий; наши данные соответствуют результатам других исследователей, показавших высокую частоту выявления кампилобактеров у людей и животных с помощью бактериологического метода.

Применение диагностикума, полученного по предлагаемому способу, позволяет проводить экспресс-диагностику кампилобактериоза у больных людей и животных, выявлять контаминацию кампилобактерами пищевых продуктов, кормов и объектов внешней среды, непосредственно в исследуемом материале без проведения бактериологического

RU 2 086 984 C1

RU 2 086 984 C1

исследования и выделения чистой культуры, требующих специальных дорогостоящих питательных сред и оборудования. Постановка РКА с помощью предлагаемого диагностикума является технически простой процедурой, а способ приготовления диагностикума и его применение, в особенности при массовых исследованиях, экономически значительно более эффективен, чем другие способы диагностики кампилобактериоза.

Формула изобретения:

1. Способ получения диагностикума для выделения термостабильных антигенов кампилобактеров, включающий раздельную иммунизацию животных культурами *Campylobacter* spp. разных серотипов с последующим забором крови от каждого животного, выделением сывороток,

сенсibilизацией полученными сыворотками клеток *Sharpliosoccus aureus* Cowan I, отмывкой, ресуспандированием и консервированием, отличающийся тем, что животных иммунизируют дезактивированной нагреванием и высушенной ацетоном микробой массой кампилобактеров внутривенно дозами 1,0 15,0 млрд клеток, а полученные от разных животных сыворотки перед сенсibilизацией смешивают.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что дезактивацию кампилобактеров проводят при температуре 100°C в течение 1 ч.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для приготовления смеси берут ограниченное (3-5) число сывороток, имеющих максимальный набор антител к термостабильным антигенам кампилобактеров разных серотипов.

RU 2086984 C1

RU 2086984 C1

Таблица 1

Антигенные связи *Campylobacter jejuni*, *coli*, *laridis* по данным реакции преципитации и иммуноэлектрофореза в агаре

ЛПС штаммов	Сыворотки сероваров <i>Campylobacter</i>														
	1	2	4	5	6	7	11	18	36	8	20	21	31	35	73
	<i>jejuni</i>									<i>coli laridis</i>					
<i>C. jejuni</i>	1	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	2	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
	4	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	-	-	-
	11	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-
<i>C. coli</i>	8	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	+	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	++	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>C. laridis</i>	35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	++	-
эц.м.	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

RU 2086984 C1

RU 2086984 C1

Таблица 2

Специфичность полivalentного кампилобактерного диагностикума
в реакции коаггутинации

Вид бактерий, сервер	Исследуемый материал	Результаты РКА
<i>Campylobacter jejuni</i> L1	ЛПС музейный штамм /ЦНИИЭ/	+
то же L2	то же	+
- " - L4	- " -	+
- " - L5	- " -	+
- " - L6	- " -	+
- " - L7	- " -	+
- " - L11	- " -	+
- " - L18	- " -	+
- " - L36	- " -	+
<i>Campylobacter coli</i> L6	ЛПС музейный штамм /ЦНИИЭ/	+
то же L20	- " -	+
- " - L21	- " -	+
<i>Campylobacter landis</i> L36	ЛПС музейный штамм /ЦНИИЭ/	+
то же L73	- " -	+
<i>Campylobacter coli</i> 38	культура, выделенная от человека музейный штамм (НИИЭМ им.Габричевского)	+
то же 315	то же	+
- " - 15	культура от больного человека	+
<i>Campylobacter cesarii</i>	культура от здорового человека	+
<i>Campylobacter jejuni</i> 265	музейный штамм	+
то же 31	культура от больной курицы	+
- " - K-2	культура от больного человека	+
- " - 35	культура от больной обезьяны	+
<i>Y.pseudotuberculosis</i> I	эталонный штамм /Швеция/	-
то же II	то же	-
- " - III	- " -	-
<i>Y. enterocolitica</i> O3	эталонный штамм /НИИЭМ им.Пастера/	-
то же O6	эталонный штамм	-
- " - O7,8	то же	-
- " - O5	- " -	-
<i>Shigella sonnei</i> 478	эталонный штамм /НИИЭМ им.Гамалеи/	-
<i>flexneri</i> 516M	музейный штамм	-
<i>newcastle</i> 1221	то же	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	музейный штамм	-
<i>choleraesuis</i>	то же	-
<i>muenchen</i>	- " -	-
<i>mission</i>	- " -	-

RU 2086984 C1

RU 2086984 C1

Таблица 3

Определение термостабильных антигенов *Campylobacter jejuni*, *coli*, *laridis* с помощью поливалентного диагностикума реакцией коагглютинации.

Объект исследования	Материал	Число проб	Частота выявления O-антигенов, %:	
			<i>Campylobacter</i>	<i>Salmonella</i>
Население различных регионов страны	ЦИК сыворотки крови	1197	0 - 10 ср. $3,76 \pm 0,56$	$8,9 \pm 0,8$
Больные люди:	копрофильтрат, слюна,	806 97	$6,7 \pm 2,3$ $14,4 \pm 5,5$ до $21 \pm 1,7$	$65,7 - 91,7$ $24,0 \pm 6,3$
Сальмонеллез ОКИНЭ	моча, кровь			
Куры	Смывы с тушек, яйца, печень, кишечник, корма	499	6 - 38	2 - 59
Обслуживающий персонал птицефабрик	Копрофильтраты, кровь, ЦИК	210	13,5 - 29	28

RU 2086984 C1

RU 2086984 C1